

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) N.º de publicación: **ES 2 100 131**

(21) Número de solicitud: 9502185

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/34

C12P 19/12

C07H 3/04

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: 08.11.95

(43) Fecha de publicación de la solicitud: 01.06.97

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.06.97

(71) Solicitante/s:

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es: Aragón Reyes, Juan José;

Cañada Vicinay, Francisco J.;
Fernández-Mayorales Alvarez, Alfonso;
López Alvarez, Rosa;
Martín Lomas, Manuel y
Villanueva Torregroza, Daniel

(74) Agente: No consta

(54) Título: Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

(57) Resumen:

Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

El objeto de la presente invención es un procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal. Dicho procedimiento implica una sola etapa de reacción y el empleo de sustratos asequibles y un biocatalizador también asequible y de bajo costo. La utilización de los compuestos obtenidos como sustratos de la lactasa intestinal, originando galactosa y xilosa como productos de hidrólisis, permite la evaluación "in vivo" de la actividad lactasa intestinal lo que puede tener particular aplicabilidad en individuos lactantes en que se sospeche la existencia de una deficiencia en este enzima.

DESCRIPCION

Procedimiento enzimático de obtención β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

Objeto de la invención

La determinación de la actividad lactasa intestinal es de importancia en pediatría y gastroenterología y puede llevarse a cabo directamente, a partir de una muestra de mucosa, o indirectamente, a partir del nivel de glucosa en sangre o del hidrógeno expirado después de la administración al paciente de una dosis de lactosa. El objeto de la presente invención es un procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal. El procedimiento de la invención permite la obtención de una serie de compuestos que actúan como sustratos de la lactasa intestinal, dando galactosa y xilosa como productos de hidrólisis, lo que permite la evaluación "in vivo" de la actividad lactasa intestinal.

Estado de la técnica

La deficiencia o baja actividad en lactasa intestinal es rara como error metabólico congénito, pero es un síndrome común en humanos adultos. En la mayor parte de los mamíferos existe una acusada disminución de la actividad lactasa desde el momento del destete, excepto en los humanos cuyos antepasados hayan dependido de un consumo sustancial de leche o productos lácteos durante largo tiempo.

En las patentes españolas con n° de solicitud P0478590, P0482073 y P0539908 se han descrito procedimientos de obtención de 3-O-metil lactosa y su utilización en la evaluación *in vivo* de la actividad lactasa intestinal. Este método siendo incruento y específico, presenta un inconveniente que deriva de la necesidad de utilizar un procedimiento cromatográfico para la detección de 3-O-metil-D-glucosa en orina, lo que circunscribe su utilización a instalaciones que tengan tal equipamiento analítico.

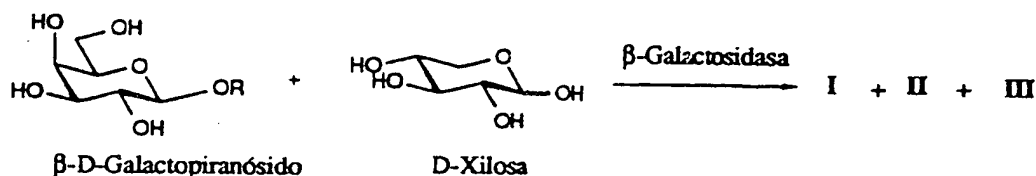
En la patente española de n° de solicitud 9001680 se describe la preparación de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (I) y su utilización en la evaluación de la lactasa intestinal *in vivo*. La sustancia I es sustrato de la lactasa intestinal dando lugar a galactosa y xilosa. La xilosa se absorbe fácilmente por el intestino y se elimina en la orina, donde puede evaluarse directamente por un sencillo método colorimétrico. La síntesis de I se lleva a cabo a partir de bencil β -D-xilopiranosido siguiendo una secuencia que implica reacciones de protección selectiva, glicosilación y desprotección. Tanto el número elevado de etapas de reacción, la utilización de reactivos caros como el triflato de plata en la reacción de glicosilación, y el empleo de columnas de cromatografía en la purificación de intermedios y el producto final, presentan dificultades para llevar a cabo el proceso sintético a escala industrial.

Explicación de la invención

El objeto de la invención es un procedimiento alternativo a los del estado de la técnica que implica una sola etapa de reacción y el empleo de sustratos asequibles y un biocatalizador también asequible y de bajo costo. El procedimiento de la invención presenta, por tanto, importantes ventajas frente a los anteriormente descritos en su explotación industrial. El procedimiento de la invención se basa en una reacción entre D-Xilosa y β -D-galactopiranosido en presencia de una enzima β -galactosidasa la cual conduce a una mezcla del compuesto I y sus regioisómeros 2-O- β -D-galactopiranosil- y 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosas (II y III respectivamente).

50

55



Los compuestos II y III son también sustratos de la lactasa intestinal que dan galactosa y xilosa como productos de hidrólisis. Así, con la lactasa intestinal de cordero a pH 6.0, los disacáridos II y III se hidrolizaron con constantes de Michaelis (K_m) = 14.0 y 4.0 mM, y velocidades máximas (V_{max}) relativas a la lactosa = 20 y 70 %, respectivamente, frente a K_m = 340.0 y 11.0 mM y V_{max} = 20 y 100 % para

los disacáridos I y lactosa respectivamente. Por tanto, la mezcla de I, II y III (ver fórmulas en Figura 1) puede ser empleada en el método de evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Fórmulas de los compuestos 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (I), 2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (II), 3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa (III).

Figura 2: Representación gráfica de la evolución de a) la hidrólisis de β -D-galactopiranosil-D-xilosas in vivo como porcentaje de xilosa eliminada en orina, y b) la actividad lactasa intestinal (nm/min/mg proteína), durante el crecimiento de la rata (días).

Descripción detallada de la invención

La reacción del procedimiento de la invención se lleva a cabo a partir de D-xilosa y un sustrato β -D-galactopiranosido, preferentemente *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosido o lactosa, en presencia de una enzima β -galactosidasa, preferentemente la β -galactosidasa de *E. coli*. La concentración de xilosa esta comprendida entre 2 y 20 veces la concentración del sustrato β -D-galactopiranosido. El medio de reacción es agua tamponada a pH de 5.0 a 9.0, en presencia o ausencia de codisolventes miscibles con agua tales como acetonitrilo, dimetilformamida ó dimetilsulfóxido. La temperatura de la reacción puede ser cualquiera dentro del rango de 4-37°C, controlándose el progreso de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Cuando se alcanza el máximo rendimiento de formación de disacáridos (después de un tiempo de entre 4 a 8 horas, dependiendo de las condiciones de temperatura y cantidad de enzima empleada), la mezcla se calienta a 100°C con objeto de desactivar la enzima. El aislamiento de los disacáridos formados puede realizarse bien por columna de filtración con Sephadex G-10 o Biogel P-2, o bien con una columna de carbón activo. El eluyente puede ser agua o mezclas agua-alcohol.

La relación de disacáridos I, II y III obtenidos de la columna cromatográfica se determinó por cromatografía de gases con un cromatógrafo equipado con detector de ionización de llama y columna capilar SE-54 (fase estacionaria: 5 % difenil y 95 % dimetilpolisiloxano, 15 m de longitud, 0.15 mm de diámetro interno y 0.3 μ m de espesor). En los análisis se empleó un flujo de nitrógeno de 1 mL/min. El programa de temperaturas utilizado fue: temperatura inicial 160°C; tiempo inicial 2 min; incremento de temperatura 5°C/min; temperatura final 250°C. Las muestras se analizaron tras trimetilsililación mediante el protocolo siguiente: una alícuota (10 μ l) se calentó a 100°C durante 10 min, tras lo cual se adicionó piridina (25 μ L) que contenía como referencia interna bencil β -D-xilopiranosido (10 mM) y N-trimetilsilimidazol (25 μ L), y se continuó la calefacción a 60°C durante 30 min. Los tiempos de retención de los picos asignables a los distintos disacáridos fueron los siguientes:

bencil β -D-xilopiranosido (referencia interna): 12.04 min.

2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 18.46 y 19.50 min.

3-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 18.30 min.

4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosa: 20.35 y 20.50 min.

Los siguientes ejemplos muestran el procedimiento de síntesis y los ensayos biológicos con los productos obtenidos.

Modo de realización de la invención

Preparación de 2-O- β -D-galactopiranosil-, 3-O- β -D galactopiranosil-, y 4-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosas (compuestos II, III y I respectivamente)

A una solución de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosido (4 g, 50 mM) y xilosa (20 g, 500mM), en agua tamponada (0.05 M KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM mercaptoetanol, 265 mL, pH 7.0), se adicionó β -galactosidasa de *E. coli* (1.5 mg, 560 U), y la mezcla se incubó a 25°C durante 5 h y 45 min. Pasado este tiempo, la mezcla se calentó a 100°C durante 10 min, se concentró y el residuo resultante se introdujo en una columna de carbón activado utilizando un gradiente de agua-etanol 1:0 --> 85:15. Se fluyen primero los monosacáridos xilosa y galactosa, y seguidamente la mezcla de 4-O- β -D-galactopiranosil-, 3-O- β -D-galactopiranosil-, y 2-O- β -D-galactopiranosil-D-xilosas. Se obtuvieron 2 g de mezcla de disacáridos (50 % relativo a los equivalentes de *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosido iniciales), en una relación I:II:III

de 8.6:1.4:1.0 respectivamente.

De las distintas fracciones que contenían los disacáridos I, II y III pudo separarse algunas con cada uno de ellos puro, que se utilizaron para caracterizarlos por RMN. El espectro de ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) de las fracciones con 4- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilosa fue idéntico al del producto previamente preparado.

Con objeto de caracterizar y determinar de forma inequívoca la regioquímica del enlace formado en los productos 2- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil- y 3- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas, las fracciones enriquecidas en estos compuestos se acetilaron y los productos resultantes se aislaron por HPLC semipreparativo (columna fase normal SiO_2 , hexano-acetato de etilo 1:1, detección por índice de refracción). Posteriormente, se registró el espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de cada uno los derivados acetilados obtenidos:

- Derivado acetilado de 2- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil- α -D-xilopiranososa
- Derivado acetilado de 2- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil- β -D-xilopiranososa
- Derivado acetilado de 3- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil- α -D-xilopiranososa
- Derivado acetilado de 3- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil- β -D-xilopiranososa

Eliminación de xilosa en orina tras administración oral de 2- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-, 3- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-, y 4- $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas

Una mezcla de $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas (compuestos I, II y III en una relación 8.6:1.4:1.0 respectivamente) preparada mediante el procedimiento referido en el apartado anterior, se ha empleado para evaluar la actividad de la lactasa intestinal. Para ello, un grupo constituido por 17 ratas lactantes de la misma camada y con 12 días de edad, se mantuvo en ayuno durante 6 horas separado de la madre. Transcurrido ese tiempo, se recogió orina basal de cada animal mediante presión vesical transabdominal e inmediatamente se administraron a cada uno 16,2 mg de la mezcla de $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas diluida en 0,3 ml de agua destilada utilizando una sonda intragástrica. A partir de ese momento se recogió orina durante las 5 horas siguientes, determinándose en la misma la xilosa eliminada mediante análisis colorimétrico basado en la reacción con floroglucinol y usándose la orina basal como blanco. Inmediatamente tras la recogida de orina, se sacrificaron tres de los animales en los que se determinó directamente la actividad lactasa en la mucosa intestinal. Para ello se reseco un trozo de intestino delgado, se lavó, se recogió la mucosa mediante raspado con vidrio y se homogeneizó ésta; midiéndose la actividad lactasa espectrofotométricamente en el homogenado. Los animales restantes fueron devueltos a la madre y con ellos se repitió el experimento en condiciones similares a los días 15, 18, 21 24 y 30 en que quedó extinguida la camada. Los resultados de esta experiencia aparecen recopilados en la Fig. 2, en la cual se refleja la hidrólisis de β -D-galactopiranosil-D-xilas in vivo y la actividad lactasa intestinal durante el crecimiento de la rata. Para ello se representa la eliminación de xilosa (%) [curva a)] y la actividad lactasa (nm/min/mg proteína) [curva b)] frente a la edad (en días). Los resultados de esta experiencia indican: 1) Que se detecta la presencia de xilosa en orina procedente de la hidrólisis de las $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas administradas por la acción de la lactasa intestinal; 2) Que el curso de la eliminación de xilosa en orina, originada por la administración oral de $\underline{\text{Q}}$ - β -D-galactopiranosil-D-xilas a lo largo del crecimiento de los animales, corre paralelo con la conocida modificación fisiológica de la actividad lactasa intestinal que declina a lo largo del desarrollo. Esta experiencia demuestra que la metodología es útil para la evaluación *in vivo* de la actividad lactasa intestinal, siendo el procedimiento empleable para la evaluación de esta actividad de manera incruenta con fines diagnósticos, lo que puede tener particular aplicabilidad en individuos lactantes en que se sospeche la existencia de una deficiencia en este enzima.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, caracterizado porque dicho procedimiento comprende:

a) reacción entre D-xilosa y un sustrato β -D-galactopiranosido en presencia de una enzima β -galactosidasa, siendo la concentración de D-xilosa de 2 a 20 veces superior a la del β -D-galactopiranosido, en un medio acuoso tamponado a pH comprendido entre 5,0 y 9,0 y a una temperatura comprendida entre 4 y 37°C.

b) desactivación de la enzima β -galactosidasa mediante calentamiento a 100°C cuando se alcanza el máximo rendimiento de formación de disacáridos detectado mediante cromatografía en capa fina.

c) aislamiento de los disacáridos formados mediante filtración en columna de relleno, utilizándose como eluyente agua o mezclas agua/alcohol.

2. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal, según la reivindicación 1, caracterizado porque el β -D-galactopiranosido utilizado es *o*-nitrofenil β -D-galactopiranosido.

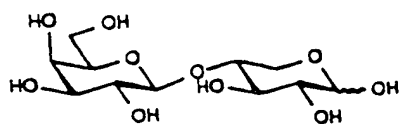
3. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal según la reivindicación 1, caracterizado porque el β -D-galactopiranosido utilizado es lactosa.

4. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal según las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque la enzima β -galactosidasa empleada es la β -galactosidasa de *E. coli*.

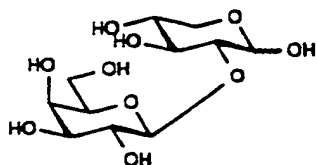
5. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal según la reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en presencia de codisolventes miscibles con agua tales como acetonitrilo, dimetilformamida ó dimetilsulfóxido.

6. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal según la reivindicaciones 1-5, caracterizado porque las columnas de filtración para el aislamiento de los disacáridos están rellenas con Sephadex G-10 ó Biogel P-2.

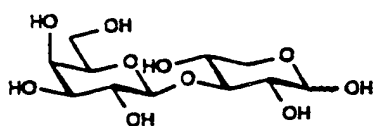
7. Procedimiento enzimático de obtención de β -D-galactopiranosil-D-xilosas utilizables para la evaluación diagnóstica de la lactasa intestinal según la reivindicaciones 1-5, caracterizado porque las columnas de filtración para el aislamiento de los disacáridos están rellenas con carbón activo.



I



II



III

Figura 1

ES 2 100 131 A1

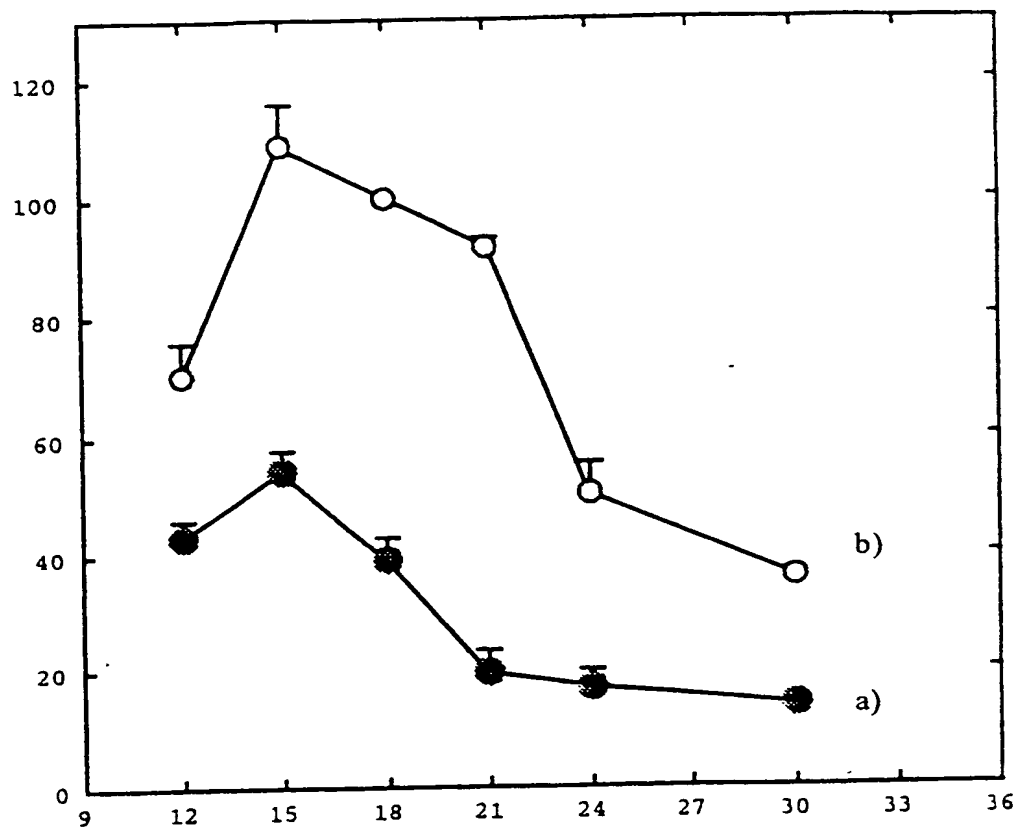


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 100 131

⑫ N.º solicitud: 9502185

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.95

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q1/34, C12P19/12, C07H3/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	R. LOPEZ et al., "Enzymic beta-galactosidation of beta-xylopyranosides", BIOTECHNOL. LETT., vol. 13, n° 10, 1991, págs.: 705-710 * todo el documento *	7
A	ES-2023556-A (C.S.I.C.) 16.01.92 * resumen; pág. 2 *	1, 7, 15
A	A. RIVERA-SAGREDO et al., "4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-xylose: a new synthesis and application to the evaluation of intestinal lactase", CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 228, 10 abril 1992, Amsterdam NL, págs.: 129-135. * todo el documento *	1, 7, 15
A	J.J. ARAGON et al., "Evaluation of rat intestinal lactase in vivo with 4-galactosylxylose", CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 210, 30 septiembre 1992, Amsterdam, NL, págs.: 221-226 * todo el documento *	1, 7, 15
A	P.A.J. GORIN et al., "The synthesis of beta-galacto- and beta-glucopyranosyl disaccharides by Sporobolomyces singularis", Can.J.Chem., vol. 42, n° 10, octubre 1964, Ottawa, CA, págs.:2307-2317. * todo el documento *	7-16
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones n°:		
Fecha de realización del informe 07.05.97	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1